(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

(43) 国際公開日
2011 年 3 月 3 日(03.03.2011)

(10) 国際公開番号
WO 2011/024999 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/50 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
A61B 1/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/064715

(22) 国際出願日: 2010 年 8 月 30 日(30.08.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
61/238,106 2009 年 8 月 28 日(28.08.2009) US

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人札幌医科大学 (SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目２９１番地 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 豊田実 (TOYOTA, Minoru) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 山本英一郎 (YAMAMOTO, Eiichiro) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 神前正幸 (KAMIMAE, Seiko) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 鈴木拓 (SUZUKI, Hiromu) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目 札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 山野泰穂 (YAMANO, Hiroo) [JP/JP]; 〒0101495 秋田県

[続葉有]

(54) Title: SPECIMEN FOR DETECTING INFILTRATIVE LARGE INTESTINE TUMORS

(54) 発明の名称 : 浸潤性大腸腫瘍検出用の検体

[図1]

図1

(57) Abstract: Provided is a method for noninvasively obtaining an index for diagnosing the infiltration or invasive depth of a large intestine tumor. The method is characterized in that a specimen by which the infiltrative large intestine tumor can be detected is obtained by spraying a cleaning solvent onto the target large intestine mucous layer to separate the mucous from said mucous layer, and recovering the separated mucous along with the cleaning solvent.

(57) 要約: 本発明は、非侵襲的に大腸腫瘍の浸潤性または深達度を診断するための指標を得る方法を提供することを目的とする。 本発明は、対象の大腸粘液層に洗浄液を散布して該粘液層から粘液を剥離し、剥離された粘液を洗浄液とともに回収することにより、浸潤性大腸腫瘍を検出しうる検体を得ることを特徴とする。

秋田市上北手猿田宇苗代沢２２２－１ 秋田赤十字病院内 Akita **(JP).**

(74) 代理人: 葛和 清司, 外 **(KUZUWA, Kiyoshi** et al.); 〒1620067 東京都新宿区富久町８番２１号 等&.T ビル 葛和国際特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a))

明細書

発明の名称：浸潤性大腸腫瘍検出用の検体

技術分野

[0001] 本発明は、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して得られる浸潤性大腸腫瘍検出用の検体、大腸粘液層を非侵襲的に剥離するためのキット、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して薬剤および／または治療方法の治療効果を評価するための指標を得る方法に関する。より具体的には、本発明は、メチル化ＤＮＡを分子マーカーとする、前記の浸潤性大腸腫瘍検出用の検体、キット、浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法、治療効果を評価するための指標を得る方法に関する。

背景技術

[0002] 欧米では、大腸癌が癌死亡率の上位を占めている。大腸癌は、米国の統計資料の２００６年度の予測によれば、男女共に３番目に多い癌種であり、その発生率は１９９８年から２００２年にかけては毎年１．８％づつ増加している。日本でも大腸癌の患者数は近年急激に増加している。これは日本人の食生活が欧米型の肉食が中心となったことに原因があると考えられている。国内では毎年約１０万人が罹患し、約４万１千人が死亡しているという報告がある。臓器別の死亡数でも、胃癌、肺癌に続く３番目の多さであり、今後のさらなる増加も予想されている。特に、女性における大腸癌は、罹患者数および死亡者数ともに全悪性腫瘍の中で第１位である。男性で肺癌、肝癌に次ぐ３位になることが推定されている。大腸癌は遺伝的素因よりも食生活、特に動物性脂肪および蛋白質の過剰摂取に起因することが疫学的に推察され、大腸部位としては、Ｓ状結腸と直腸に発症しやすい。

[0003] しかしながら、大腸癌は他の癌と異なり、早期癌であれば手術により、１００％近く治せることが知られている。そのため、大腸癌は早期癌検診の対象となり、数多くの検査法が開発されてきた。

[0004] また、早期癌については、内視鏡的粘膜切除術や内視鏡的粘膜下層剥離術といった内視鏡を用いた手術が非常に有効である一方で、浸潤腫瘍では、開腹手術と化学療法剤や放射線療法を併用する等の治療法が一般に行われている。したがって、非侵襲的に癌または腫瘍の浸潤性または深達度を事前に評価しうる診断方法の開発が待たれている。

[0005] 大腸は、内腔側から順に粘膜、粘膜下層、固有筋層、漿膜下層および漿膜の５層構造を形成しており、下部直腸では漿膜および漿膜下層を欠いた３層構造を形成している。大腸腫瘍は粘膜から発生し、腫瘍の進行とともに深層へ浸潤する。このうち、腫瘍の浸潤が粘膜下層までにとどまるものを早期癌と呼ぶ。

[0006] 一般に、消化器癌、特に、大腸癌、直腸癌等の一般的な検査法として、（ｉ）便潜血検査、（ｉｉ）直腸内触診、（ｉｉｉ）血液検査、（ｉｖ）注腸検査、（ｖ）ＰＥＴ検査（ポジトロン断層撮影法）、（ｖｉ）内視鏡検査、（ｖｉｉ）カプセル内視鏡検査、（ｖｉｉｉ）糞便または生検組織を用いる遺伝子診断がある。

[0007] しかし、これらの検査方法は、早期癌の発見、治療効果の測定、再発・転移の判断材料の提供、または確定診断を目的としており、いずれの方法を用いても、癌または腫瘍の浸潤度を診断するための指標を得ることはできない。

[0008] 便潜血検査は、ヒトヘモグロビンのペルオキシダーゼ活性またはヒトヘモグロビンに反応するモノクローナル抗体を利用して、便中への出血の有無及び出血量等を検査し、間接的に大腸腫瘍の発生を予測する方法であり、簡便・安価で非侵襲的検査である。しかし、潜血反応検査の有効性は、大腸腫瘍からの出血が間欠的であることにより損なわれ、偽陰性の判定の割合を高めている。例えば、結腸直腸腫瘍と診断された患者の約５０%が便潜血検査で陰性の判定を受けている。また、直径２0mm未満の小さな結腸直腸腫瘍からの、１日当たりの出血量は1～2mlと非常に小さいため、潜血試験によって常に検出されるわけではない。さらに、例えば、歯肉炎、痔、潰瘍、アスピリンの

使用による腸管出血など、多くの大腸腫瘍以外の原因による出血によってもー陽性の判定を引き起こし得るため、便潜血検査による陽性判定被験者の中で実際に大腸腫瘍であるのは3～5％に過ぎず、便潜血検査による陽性判定被験者の中には多くの偽陽性を含まれている。このように、便潜血検査は、大腸腫瘍等の腫瘍の特異的検出法とは言えず、大腸腫瘍等の予備診断方法としても必ずしも十分ではない。まして、便潜血検査によって、大腸腫瘍の浸潤度を診断することはできない。

[0009] 直腸内触診によれば、指診により大腸／直腸の遠端における腫瘍を検出することが可能であるが、より内部の腫瘍を発見することはできない。また、直腸内触診によって、大腸腫瘍の浸潤度を診断することはできない。

[0010] 血液検査は、対象の血液試料中の腫瘍マーカーを測定して、腫瘍マーカーの量または濃度によって大腸腫瘍を診断する診断方法である。

[0011] 腫瘍マーカーとしては、胎児性蛋白質（ＡＦＰ、ＣＥＡ等）、糖鎖抗原（ＣＡ１９－９、シリアルＴｎ等）、異所産生物質（ホルモンや腫瘍性アイソザイム等）のように、その物質を検出することによって大腸癌と診断する腫瘍マーカーと、癌遺伝子（ｒａｓ、ｅｒｂＢ等）、癌抑制遺伝子（ｐ５３等）、遺伝子再構成（ＢＣＲ－ＡＢＬ等）のように遺伝子の変異や組換えを検出することによって情報が得られる腫瘍マーカーとがある。

[0012] しかし、血液中の腫瘍マーカーは、大腸癌がない場合にも陽性となることがあり、また、ある程度まで大腸癌が進行しなければ陽性とならないことがあり、逆に進行大腸癌でも陽性にならないこともあるなどの欠点がある。そのため、大腸癌の腫瘍マーカーは早期発見や確定診断につながるほどの効果はなく、現状としては補助診断や治療の効果の測定、再発・転移の発見の判断材料の1つとして用いられている。また、血液中の腫瘍マーカーの濃度によって、大腸腫瘍の浸潤度を診断することはできない。

[0013] 注腸検査とは、バリウムを大腸内に注入し、大腸の粘膜面に付着させ、その表面の凹凸をX線により調べる方法である。しかしながら、注腸検査は、コストが高い上に被験者への負担が大きく、合併症のリスクを伴うという問

題がある。例えば、注腸検査では、検査の前日に低脂肪・低残渣よりなる注腸検査食を摂取させた後、下剤（塩類下剤及び接触性下剤）の投与により大腸内容物を除去する前処置が被験者に施される。また、注腸検査には、X線被爆や腸閉塞の危険性がある。また、注腸検査は腸の内腔の凹凸の形態のみを調べる検査であるため、注腸検査によって、大腸腫瘍の浸潤度を診断することはできない。

[0014] PET検査（ポジトロン断層撮影法）とは、陽電子放出核種で標識した薬剤を被検体に投与して、薬剤がどの部位で多く消費されているかを調べる方法である。例えば、糖の一種で腫瘍に集積する性質を持つ18Fで標識したフルオロデオキシグルコースをPET用薬剤として被検者に投与して、ガンマ線を体外から観測することによって、ラベルされた物質の体内分布を映像化し、その体内動態を確認し、病巣の位置や大きさ等を検査するものである。

[0015] PET検査は一般にサイクロトロンを必要とし，設備に10億円以上の高額な費用が必要である。また、PET検査を行なうと放射線被ばくは避けられない。また、PET検査によって、およその腫瘍の大きさは測定できても、大腸腫瘍の浸潤度を診断することはできない。

[0016] 内視鏡検査は大腸の中を直接内視鏡で調べる方法である。内視鏡検査は大腸腫瘍の発見に対して、高い感度と特異性を有している。加えて、内視鏡検査では早期癌や前癌状態のポリープを切除できる利点も有している。さらに、内視鏡検査ではバイオプシー（組織生検）により診断用の組織を採取できる利点も有している。しかし、内視鏡検査は、腸の表面を内腔側から観察するものであるため、内視鏡検査によって、大腸癌の浸潤度を診断することはできない。実際、大腸の内視鏡検査で発見される腫瘍の中には、小さな病変であっても、大腸粘膜下組織への浸潤を認める腫瘍が多数報告されている。

[0017] また、内視鏡検査による組織生検では、組織を「点」で評価できるにすぎず、これを「面」に広げていくには物理的限界がある。内視鏡検査による組織生検では、病変の一部のみの評価であるため、生検の採取部位によって、または内視鏡的粘膜切除された病変であっても標本の切り出し部位によって

は、大腸癌であることを確定診断することはできない。まして、内視鏡検査による組織生検を用いて、腫瘍の深達度を正確に診断することできない。

[0018] 一般的に、大腸癌の確定診断には、生検材料を用いた病理組織診断が行なわれているが、大腸腫瘍を確定診断するためには詳細な内視鏡観察にもとづいた病理組織標本の作製が必須である。しかし、そのような病理組織標本の作製には、極めて熟練した技術が必要であるので、全ての内視鏡医師が行なうことは困難である。

[0019] また、微小な腫瘍や大腸粘膜切除前の腫瘍に関しては、生検することによって、手術後の病理像が不確かになる、などの理由から、内視鏡による大きさ、形態観察や拡大内視鏡によるピット診断のみに基づいて、内視鏡切除か、開腹手術かの判断がなされてきた。

[0020] カプセル内視鏡検査とは、超小型カメラを内蔵したカプセルを口から飲み込み、消化管を通過しながらカプセルが自動的に撮影した画像情報を無線により体外に転送する、消化管の検査方法である。カプセル内視鏡検査は、通常の内視鏡に比べて画像の精度が低く、自動撮影であるため精査したい襄の奥などを十分に観察できず、生検やポリープ切除ができないなどの欠点があり、現状では、もっぱら、通常の内視鏡で観察することの困難な小腸の検査に用いられている。また、カプセル内視鏡検査も、腸の表面を内腔側から観察するものであるため、内視鏡検査によって、大腸腫瘍の浸潤度を診断することはできない。

[0021] 糞便または生検組織を用いる遺伝子診断は、糞便中に剥離した腫瘍細胞または生検組織中の腫瘍細胞の遺伝子を調べることにより、大腸癌の診断を行なう方法である。一旦、腫瘍細胞に生じた遺伝子変異やＤＮＡの過剰メチル化は、正常な状態に戻りにくいという意味で固定的情報であるので、検体が適正であれば、遺伝子診断は信頼性の高い診断方法である。

[0022] しかし、糞便を用いて遺伝子診断を行なった場合には、糞便中には様々な細菌や正常細胞由来の核酸が存在しているため、糞便から回収される腫瘍細胞由来の遺伝子の割合が相対的に微量（約０．０５％）になってしまい、正

確な診断が困難になることが問題となる。例えば、非特許文献「および２には、糞便中のＤＮＡを用いて大腸腫瘍を診断する方法が一定の成果を示したことが記載されている。しかし、これらの方法は、診断可能性や診断精度に問題があり、実用化にはほど遠い水準にとどまっている。

[0023] 一方、生検組織を用いて遺伝子診断を行なった場合には、採取部位による結果のばらつきが問題になる。また、微小な腫瘍や大腸粘膜切除前の腫瘍に関しては、生検することにより線維化、熱凝固変性などが生じ、術後の病理像が不確かになるという問題点がある。

[0024] 大腸腫瘍の遺伝子診断の対象となる遺伝子の変化は、ｒａｓ、ｅｒｂＢ等の発癌遺伝子の変異、ｐ５３等の癌抑制遺伝子の変異、ＢＣＲ－ＡＢ」等の遺伝子再構成を検出するものの他、癌抑制遺伝子のプロモーター領域のＣｐＧアイランドの過剰メチル化などのエピジェネティックな修飾がある。

[0025] 癌抑制遺伝子のプロモーター領域に存在するCpGアイランドがメチル化されると、当該癌抑制遺伝子の転写が不活性化されるため、細胞増殖の制御が効かなくなり、癌などの細胞増殖性疾患が進行する。例えば、癌細胞においては、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/c、p16INK4A、日カドヘリン、hMLH1、14-3-3 sigma、BH3 Onlyファミリー遺伝子の一つであるBNIP3、ユビキチンリガーゼCHFR、MHC class II分子の転写共役因子であるIIITA、大腸癌におけるBRAFの負の制御遺伝子IGFBP7、Histone H3K27、アポトーシス関連遺伝子であるHRK、CACNA「G、COX２、DNMA5、Rasの制御遺伝子であるRASSF2等のゲノム遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドの過剰メチル化により発現が抑制されており、大腸腫瘍の診断に有用であると報告されている。

[0026] 過剰メチル化は微量なDNAから検出が可能であり、一旦生じた過剰メチル化は自然には正常に戻りにくいという意味で固定的情報であり、遺伝子診断のための指標として有用であると考えられている。しかし、糞便または生検組織の遺伝子診断では腫瘍の存在診断は可能であるが、腫瘍の浸潤度の診断はできない。

[0027] 近年、内視鏡技術の進歩により、手術せずに内視鏡により大腸腫瘍が治療

されることが多くなってきた。しかし、事前に生検すると内視鏡治療が困難になったり、切除標本の正確な病理診断が困難となるなどの問題がある。一部の内視鏡専門施設では、生検をせずに極めて詳細な拡大内視鏡観察、切除標本の顕微鏡観察により確実な診断がなされているが、限られた施設でのみ実施可能であるのが現状である。

[0028] このように、生検をせずに、大腸腫瘍細胞の遺伝的性質を精度よく決定する方法は、これまで知られていない。特に、大腸粘液層剥離液を用いて、大腸腫瘍細胞のDNAメチル化を解析する方法はこれまでに知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0029] 非特許文献1 :Ahlquist DA et al., Gastroenterology. 2000 Nov;119(5):1219-27

非特許文献2 :Osborn NK et al., Gastroenterology. 2005 Jan;128(1):192-206

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0030] したがって、本発明は、上記のような欠点を有しない、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して得られる浸潤性大腸腫瘍検出用の検体、大腸粘液層を非侵襲的に剥離するためのキット、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して薬剤および／または治療方法の治療効果を評価するための指標を得る方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0031] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行ったところ、意外にも、対象の大腸粘液層に洗浄液を散布して該粘液層から粘液を剥離し、剥離された粘液を洗浄液とともに回収することにより、浸潤性大腸腫瘍を検出しうる検体を得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0032] すなわち、本発明は、以下の検体、キット、または方法に関する。

[1] 浸潤性大腸癌検出のための検体であって、大腸粘液層に洗浄液を散布して大腸粘液を剥離し、剥離した大腸粘液とともに回収して得られる前記洗浄液を含む、前記検体。

[2] 大腸粘液層が、腫瘍部位を含む大腸粘液層である、[1]に記載の検体。

[3] 洗浄液が、生理的な等張液である、[1]または[2]に記載の検体。

[4] 生理的な等張液が、生理食塩水である、[3]に記載の検体。

[5] 散布が、毎秒2ml～10mlの速度で行なわれる、[1]～[4]のいずれか一項に記載の検体。

[6] 検出が、腫瘍マーカーの検出である、[1]～[5]のいずれか一項に記載の検体。

[7] 腫瘍マーカーの検出が、メチル化DNAの検出である、[1]～[6]のいずれか一項に記載の検体。

[8] メチル化DNAの検出が、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/c、p16INK4A、Eカドヘリン、hMLH1、14-3-3 sigma、BNIP3、CHFR、CUTA、IGFBP7、Histone H3K27、HRK、CACNA1G、COX2、DNMA5、RASSF2からなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAの検出である、[1]～[7]のいずれか一項に記載の検体。

[9] メチル化DNAの検出が、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/cからなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAの検出である、[8]に記載の検体。

[10] 洗浄液が、前洗浄なしで散布される、[1]～[9]のいずれか一項に記載の検体。

[11] 腫瘍部位が、腫瘍の浸潤が疑われる腫瘍部位である、[2]に記載の検体。

[12] 検体が、10μg以上のDNAを含む、[1]～[11]のいずれか一項に記載の検体。

[13] 浸潤性大腸癌検出のためのキットであって、大腸粘液層に洗浄液を散

布して大腸粘液を剥離するための洗浄液散布用器具および洗浄液を含む、前記キット。

[「4] 浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法であつて、

大腸粘液層に洗浄液を散布して大腸粘液を剥離する工程、

剥離した大腸粘液とともに洗浄液を回収する工程、

回収した洗浄液中の腫瘍マーカーの量を決定する工程、および、

腫瘍マーカーの量に基づいて浸潤性大腸腫瘍が存在すると決定するための指標を得る工程、

を含む、前記方法。

[「5] 大腸粘液層が、腫瘍部位を含む大腸粘液層である、[14]に記載の方法。

[「6] 洗浄液が生理的な等張液である、[「4または[「5]に記載の方法。

[「7] 生理的な等張液が、生理食塩水である、[「6]に記載の方法。

[「8] 散布が、毎秒2ml~「0mlの速度で行なわれる、[「4]~[「7]のいずれか一項に記載の方法。

[「9] 腫瘍マーカーが、メチル化DNAである、[「4]~[「8]のいずれか一項に記載の方法。

[20] 腫瘍マーカーが、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/c、p16INK4A、Eカドヘリン、hMLH1、14-3-3 sigma、BNIP3、CHFR、CUTA、IGFBP7、Histone H3K27、HRK、CACNA1G、COX2、DNMA5、RASSF2からなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAである、[「4]~[「9]のいずれか一項に記載の方法。

[2「] 腫瘍マーカーが、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/cからなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAである、[20]に記載の方法。

[22] 指標が、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが45%を越えている場合である、[「4]~[2「]のいずれか一項に記載の方法。

[23] 指標が、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが5「%

を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[24] 指標が、S RP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[25] 指標が、S RP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが33%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[26] 指標が、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合である、[14]〜[21]のいずれか一項に記載の方法。
[27] 指標が、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「「%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[28] 指標が、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[29] 指標が、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「8%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[30] 指標が、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、かつ、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[3「] 指標が、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%以下であり、かつ、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[32] 指標が、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、S RP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが5「%を越えていて、かつ、S RP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合である、[「4]〜[2「]のいずれか一項に記載の方法。
[33] 指標が、薬剤および/または治療方法の治療効果を評価するために用いる指標である、[「4]〜[32]のいずれか一項に記載の方法。

発明の効果

[0033] 本発明の検体、キット、および方法は、対象の大腸の病変部の粘膜に付着している大腸粘液層を洗浄することにより得られる大腸粘液層剥離液を用いるものであり、大腸粘膜生検組織を用いるこれまでの方法とは根本的に異なるものである。

[0034] 大腸粘液層剥離液を用いる木発明の検体、キット、および方法によれば、大腸粘膜生検組織を用いるこれまでの方法とは異なり、癌または腫瘍の浸潤度が高くなる程、多くの腫瘍細胞を大腸粘液層から回収することができる。また、本発明の検体、キット、および方法によれば、癌または腫瘍の浸潤度が高くなる程、多くの腫瘍細胞由来のメチル化ＤＮＡを大腸粘液層から回収することができる。したがつて、本発明の検体、キット、および方法は、癌または腫瘍の浸潤度を診断する指標を得るための検体、キット、および方法として、有用であり、これまでの方法では達成できなかつた、種々の有益な効果が得られる。

[0035] すなわち、本発明の検体、キット、および方法は、今まで廃棄してきた洗浄液を材料とするために、内視鏡を利用した他の検査方法によつて生じ得る様々なリスク（出血の危険性（生検法）、アレルギー、検査時間の延長（拡大内視鏡）、高価な設備（拡大内視鏡、ＮＢＩ））が新たに発生することもなく、検体の採取が簡便なため、内視鏡施行医、介助看護師にほとんど負担をかけることがない。さらに、本発明の検体、キット、および方法においては、市販の内視鏡装置がそのまま利用できるため、新たな設備投資が不要である。

[0036] また、本発明の検体、キット、および方法により、病変部の粘膜面全体を洗浄するだけで「面」での評価が可能となり、しかも生検のように組織に傷を作らないため、止血機能や創傷治癒能力などが減退している対象においても、また、抗血小板薬、抗凝固薬等の止血や創傷治癒に影響する薬剤を内服したままでも検査を行うことができる。内視鏡検査を必要とする対象に高齢者が比較的多く、したがつてかかる薬剤を常用する者の割合も多いため、か

かる利点の意義は極めて大きい。

[0037] 本発明の検体、キット、および方法によれば、手術前に腫瘍を傷つけることなく、細胞診、DNA診断を行なうことが可能である。したがって、本発明の検体、キット、および方法により、腫瘍の性質、浸潤度予測の精度が飛躍的に向上する。また、本発明の検体、キット、および方法により、手術前に大腸腫瘍の遺伝的プロファイルを診断することが可能となる。

[0038] また、本発明の検体、キット、および方法により、ゲノムDNAのジェネティックまたはエピジェネティックな異常の検出をすることが可能である。さらに、本発明による方法で採取した検体を用い、抗癌剤を包含する様々な薬剤の感受性を検討することもできる。さらにまた、本発明の検体や方法により、薬剤および／または治療方法の治療効果を評価することが可能となる。本発明の検体や方法により、再発の予測をするための指標を得ることが可能となる。

[0039] 本発明の検体、キット、および方法を用いた大腸粘液層剥離液を用いた過剰メチル化の解析によれば、非侵襲的な方法でどの施設でも簡便に浸潤性大腸腫瘍の正確な診断が可能になる。したがって、本発明の検体、キット、および方法は極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0040] [図1]洗浄液を大腸粘膜に散布して該粘液層から粘液を剥離する過程を示す写真である。Aは洗浄液を散布する前の腫瘍部分を、日は洗浄液を腫瘍部分に散布している様子を、Cは洗浄液を散布した後の腫瘍部分を、それぞれ、示す。

[図2]洗浄液を大腸粘液層に散布して該粘液層から粘液を剥離することにより得られた細胞の写真である。「方法「」は水を大腸粘液層に散布して該粘液層から粘液を剥離することにより得られた細胞の写真を、「方法2」は生理食塩水を大腸粘液層に散布して該粘液層から粘液を剥離することにより得られた細胞の写真を、それずれ示す。細胞の染色は、ヘマトキシリン・エオジン染色により行なった。

[図3]浸潤腫瘍、非浸潤腫瘍、または非癌患者の大腸におけるメチル化されたＤＮＡの割合を、生検組織と大腸粘液層剥離液のそれぞれについて比較した図である。図中、各点は各症例を示す。縦軸は、miR-34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2の各遺伝子のプロモーター領域におけるCpGアイランドのメチル化されたDNAの割合を示す。「Biopsy samples」は生検組織を、「Washing fluids」は大腸粘液層剥離液を示す。「IT」は浸潤腫瘍を、「NIT」は非浸潤腫瘍を、「Normal」は非癌患者をそれぞれ示す。「N=」の後に記した数値は症例数を示す。「NS」は有意差がないことを、「P<」と記した後の数値は有意差の水準を示す。例えば、「P<0.0001」と記されていれば、0.01%の有意水準で統計的な有意差があることを示す。なお、図中の水平線は平均値を示す。

[図4]ROC曲線（受信操作特性曲線またはReceiver Operating Characteristic curveともいう）を示す図である。ROC曲線を作成してベストカットオフ値を決定することにより、洗浄液として生理食塩水を散布して回収した検体（方法２）の各遺伝子のメチル化DNAの割合によって、浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍を区別するために最も適した閾値を決定することができる。mir-34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2、は、それぞれ、遺伝子名を示す。縦軸の「Sensitivity」は「感度」を示し、横軸の「1-Specificity」は「1-特異度」を示す。「AUC」はROC曲線の下側の面積を示す。「Best Cut-off」は、浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍を区別するために最も適した閾値である「ベストカットオフ値」を示す。図中において、「Sensitivity」の右側に示した数値は「ベストカットオフ値」における感度を、「Specificity」の右側に示した数値は「ベストカットオフ値」における特異度をそれぞれ示す。

[図5]腫瘍の大きさを、直径20mm未満の場合（左側の図）と、直径20mm以上の場合（右側の図）に分けた場合のメチル化DNAの割合のROC曲線を示す図である。左側の図は、腫瘍の大きさが直径20mm未満である場合において、mir-34b/cとSFRP1の各遺伝子のメチル化DNAの割合のROC曲線を示し、右側の図は、腫瘍の大きさが直径20mm以上である場合において、mir-34b/cとDKK2の各遺伝子のメチル化DNAの割合のROC曲線を示す。縦軸の「Sensitivity」

は「感度」を示し、横軸の「1-specificity」は「1-特異度」を示す。

[図6]複数の遺伝子のメチル化DNAの割合を指標として浸潤腫瘍の有無を診断する場合の判断過程を示す図である。図中、「Tumor size 20mm <」は腫瘍の直径が20mm以上であるという判断基準を示す。「miR34b/c 15% <」はmiR34b/c遺伝子のメチル化されたDNAの割合が15%超であるという判断基準を示す。「SFRP1 51% <」はSFRP1遺伝子のメチル化されたDNAの割合が51%超であるという判断基準を示す。「DKK2 10% <」はDKK2遺伝子のメチル化されたDNAの割合が10%超であるという判断基準を示す。「SFRP2 10% <」はSFRP2遺伝子のメチル化されたDNAの割合が10%超であるという判断基準を示す。棒線の間に位置する「Yes」はその左側の判断基準を満たす場合を示す。同様に、棒線の間に位置する「No」はその左側の判断基準を満たさない場合を示す。「Invasive Cancer」は浸潤腫瘍であるという診断結果を示す。「Non-invasive tumor」は非浸潤腫瘍であるという診断結果を示す。枠内の「Yes」の右側の数値の分母は枠内の判断基準を満たす症例数を、分子は枠内の判断基準を満たす症例のうちで浸潤腫瘍である症例数を、それずれ示す。枠内の「No」の右側の数値の分母は枠内の判断基準を満たさない症例数を、枠内の「No」の右側の数値の分子は枠内の判断基準を満たさない症例のうちで浸潤腫瘍である症例数を、それずれ示す。「P<」と記した後の数値は有意差の水準を示す。例えば、「P<0.001」と記されていれば、0.1%の有意水準で統計的な有意差があることを示す。

[図7]洗浄液として生理食塩水を散布して回収した検体（方法２）の各遺伝子のメチル化DNAの割合と生検組織中の各遺伝子のメチル化DNAの割合の相関を検討した図である。図中、各点は各症例を示す。mir-34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2、は、それぞれ、遺伝子名を示す。縦軸の「Wash」は「生理食塩水を腫瘍に散布して得た大腸粘液層剥離液中のメチル化DNAの割合」を示し、横軸の「biopsy」は「生検組織中のメチル化DNAの割合」を示す。図中の実線は共分散分析法による回帰直線をしめし、当該実線の上下に位置する点線は信頼性95%での信頼限界を示す。「R=」の右側の数値はPearsonの相関係数を、「

P=」の右側の数値は危険率を示す。

発明を実施するための形態

[0041] 以下、本発明の好適な態様について詳細に説明する。

本発明は、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して得られる浸潤性大腸腫瘍検出用の検体、大腸粘液層を非侵襲的に剥離するためのキット、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法、大腸粘液層を非侵襲的に剥離して薬剤および／または治療方法の治療効果を評価するための指標を得る方法に関する。

[0042] 本発明に用いる洗浄液は、大腸の粘膜を傷つけることなく大腸粘液層を剥離しうる液体が好ましく、より好ましくは等張液であり、さらに好ましくは生理食塩水である。また、本発明に用いる洗浄液は、大腸の粘膜を傷つけることなく大腸粘液層を剥離しうる液体であるかぎり、色素、抗生物質、中性の緩衝性組成物、キレート剤、保存用の添加物等の任意の添加物を含んでいてもよい。

[0043] 本発明において、洗浄液は、大腸の粘膜を傷つけることなく大腸粘液層を剥離しうる速度で大腸粘液層に散布され、好ましくは毎秒２ｍｌ～「０ｍｌの速度で、より好ましくは毎秒３ｍｌ～８ｍｌの速度で、さらに好ましくは毎秒４ｍｌ～６ｍｌの速度で、大腸粘液層に散布される。

[0044] 本発明において洗浄液の回収方法は特に限定されないが、内視鏡装置を利用する場合は、例えば、吸引管路中の操作部、コネクタ部、吸引タンク、吸引器またはこれらの間の部分等に、少なくとも「個の密封可能な検体採取容器を接続する方法を挙げることができる。洗浄・滅菌の簡便性、コンタミネーションのリスクなどを考慮すると、検体採取容器はコネクタ部と吸引タンクとの間に取り付けるのが好ましい。また、操作性や洗浄の簡便性などの観点から、検体採取容器は脱着可能に取り付けることが好ましい。典型的には、例えば、コネクタと吸引タンクとをつなぐ吸引チューブを、吸引タンク側で取り外し、これを検体採取容器に設けた流人側接続部に接続し、検体採取容器に設けた流出側接続部を吸引タンクに接続する。内視鏡装置は、検体採

取容器を保持する部材を備えていることが好ましい。上記検体採取容器は、1個のみを接続してもよいし、複数個を直列または並列に接続してもよい。

[0045] 本発明において用いる腫瘍マーカーは、大腸粘液層剥離液を用いて腫瘍細胞を検出しうる腫瘍マーカーであるかぎり、任意の腫瘍マーカーを用いることができる。例えば、ヘマトキシリン・エオジン染色等のマーカーにより染色した細胞を組織学的に診断する方法を用いることができ、好ましくは、胎児性蛋白質（ＡＦＰ、ＣＥＡ等）、糖鎖抗原（ＣＡ１９－９、シリアルＴｎ等）、異所産生物質（ホルモンや腫瘍性アイソザイム等）のように、その物質を検出することによって大腸腫瘍と診断しうる腫瘍マーカーであり、より好ましくは、癌遺伝子または癌抑制遺伝子である。癌遺伝子または癌抑制遺伝子の例としては、APC、K-RAS、H-RAS、N-RAS、erbB、p53、p16、BCR-ABL、CHFR、RASSFファミリー、SFRPファミリー、MINTファミリー、MGMT、RUNXファミリー、SMADファミリー、PRDMファミリーなど癌関連遺伝子、EBVおよびその関連遺伝子、CMVおよびその関連遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されず、現在は知られていないが、将来において発見される様々な癌遺伝子または癌抑制遺伝子を用いることができる。本発明において用いる腫瘍マーカーは、よりさらに好ましくは、腫瘍関連遺伝子のメチル化DNAの検出であり、最も好ましくは、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/c、p16INK4A、Eカドヘリン、hMLH1、14-3-3 sigma、BNIP3、CHFR、CIITA、IGFBP7、Histone H3K27、HRK、CACNA1G、COX2、D NA5、RASSF2からなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡの検出である。

[0046] 本発明はさらに、本発明の検体から核酸を抽出する工程を含む、腫瘍マーカーを検出する方法に関する。

[0047] 本発明の方法において、検体からの腫瘍マーカーの抽出には公知の任意の方法を用いることができる。典型的には検体を遠心分離し、得られたペレットを適切な媒体、例えばＰＢＳや生理食塩水などに再懸濁してから、プロテイナーゼＫなどのタンパク溶解剤等で消化し、フェノール、クロロホルム等の有機溶媒で除蛋白し、エタノール等で核酸を沈殿することにより、核酸を

抽出することができる。具体的なプロトコルに関しては、遺伝子工学に関する種々の文献（例えば、Chomczynski,P., Sacchi, N.:Anal. Biochem., 162:156-159, 1987、村松正實、山木雅編、新遺伝子工学ハンドブック、改訂第４版、羊土社、2003年10月、20〜29頁等）に記載されているので、ここに詳細は記載しない。

[0048] 検体は採取後直ちに抽出処理に供することが好ましいが、抽出処理まで一定時間、例えば「2時間程度、さらには24時間程度にわたって保存することができる。好ましい保存温度は、腫瘍マーカー保護の観点から、好ましくは−80℃〜20℃、より好ましくは−80℃〜「0℃、特に好ましくは−80℃〜4℃である。検体を保存する場合は、遠心分離後、上記適切な媒体中に再懸濁した状態で保存することが好ましい。

[0049] 抽出された核酸は、その後、標的疾患マーカーに対応した種々の検出方法、例えば、PCR法、NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) 法、TMA (Transcr iption Mediated Amplification) 法、LCR (Ligase Chain Reaction) 法、SDA (Strand displacement amplification) 法、LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法、ICAN (Isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids) 法、branched DNA法などの各種核酸増幅法、サザンブロット法、ノザンブロット法、RNaseプロテクションアッセイ、マイクロアレイ法、ドットブロットまたはスロットブロット法等により検出することができる。

[0050] 特に、マーカーがエピジェネティックなメチル化ＤＮＡである場合は、例えばbisulfiteシーケンス法、メチル化特異的ＰＣＲ（ＭＳ−ＰＣＲ）、Combined bisulfite restriction assay（ＣＯＢＲＡ）、ＭＳ−ＳＮｕＰＥ、bisulfite−ＳＳＣＰ、ＤＭＨ (differential methylation hybridization) 法、MethyLight法、Pyrosequencing法等の手法で検出することができる。

[0051] また、核酸の定量には、２６０ｎｍ前後の吸収極大波長における吸光度を測定する分光光度法や、核酸を染色する種々の試薬、例えば、エチジウムブロマイド、ＤＡＰＩ（４，６−ジアミジン−２−フェニールインドール）、

アクリジンオレンジ、Mupid（登録商標）-STAIN eye（株式会社アドバンス）、ジフェニルアミン試薬、ヘキスト３３２５８（Ｈ３３２５８）、Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent（Invitrogen）、Quant-iT RiboGreen（登録商標）RNA Reagent（Invitrogen）、Gel Indicator RNA Staining Solution（フナコシ株式会社）、SYBR（登録商標）Green IまたはII、SYBR（登録商標）Gold、GelRed等を用いた方法を含む、任意の既知の方法を利用することができる。

[0052] 本発明において、大腸粘液層剥離液は、前洗浄なしで洗浄液を大腸粘液層に散布して得ることができ、好ましくは、癌または腫瘍の浸潤が疑われる部位に直接洗浄液を散布して得ることができる。

[0053] 本発明に用いる洗浄液は、１０〜100ml であることが好ましく、より好ましくは15〜50ml、さらに好ましくは17〜30ml、もっとも好ましくは20ml である。本発明によれば、少なくとも１０μｇ以上のDNAを含む浸潤性大腸腫瘍検出用の検体を得ることができ、好ましくは１２μｇ以上のDNAを含む浸潤性大腸腫瘍検出用の検体を得ることができ、さらに好ましくは１５μｇ以上のDNAを含む浸潤性大腸腫瘍検出用の検体を得ることができる。

[0054] 本発明のキットは、前記の好ましい洗浄液と、大腸の粘膜を傷つけることなく大腸粘液層を剥離しうる洗浄液散布用器具を含むことができる。

[0055] 本発明の浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法は、洗浄液を大腸粘液層に散布して該粘液層から粘液を剥離することにより、剥離された粘液を前記洗浄液中に含む検体を採取する工程と、前記検体中の核酸を抽出する工程と、前記核酸中の腫瘍マーカーの存在又は不在を決定する工程を含むことができる。

[0056] 本発明において、SFRP1遺伝子のメチル化ＤＮＡを指標として浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断するための判断基準としては、好ましくは、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが４５％を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができ、より好ましくは、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが５１％を越えている場合に浸潤性大腸腫

瘍が存在すると判断することができる。

[0057] 本発明において、SFRP2遺伝子のメチル化DNAを指標として浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断するための判断基準としては、好ましくは、SFRP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが10%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができ、より好ましくは、SFRP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが33%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。

[0058] 本発明において、DKK2遺伝子のメチル化DNAを指標として浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断するための判断基準としては、好ましくは、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが10%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができ、より好ましくは、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが11%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。

[0059] 本発明において、mir-34b/c遺伝子のメチル化DNAを指標として浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断するための判断基準としては、好ましくは、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができ、より好ましくは、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「8%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。

[0060] 本発明においては、大腸の内腔側から観察した腫瘍の大きさと、複数の遺伝子のメチル化DNAを指標として、より精度よく、浸潤性大腸腫瘍の存在を診断することができる。例えば、腫瘍の大きさとしては、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上である場合に、浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。また、例えば、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、hsa-mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。他の態様としては、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、hsa-mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化D

NAが「5%以下であり、かつ、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。さらに、他の態様としては、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが5「%を越えていて、かつ、SFRP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合に浸潤性大腸腫瘍が存在すると判断することができる。

[0061] また、本発明の浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法は、薬剤および/または治療方法の治療効果を評価する方法としても用いることができる。

[0062] 例えば、治療前のマーカーレベルと治療後のマーカーレベルとの比較、または、治療中のある時点でのマーカーレベルと、その時点より後の治療中の別の時点でのマーカーレベルとの比較により、標的疾患の進行が減速もしくは停止するか、標的疾患が消退していれば、治療効果ありと、あるいは、標的疾患の進行に影響を与えない場合には治療効果なしと評価することができる。

[0063] 本発明の方法はまた、治療終了後の疾患再発の有無をモニターすることに利用することができる。この場合、治療終了後に対象から定期的に検体を採取し、マーカーレベルをもとに上記と同様の手法で疾患の存否を検査する。

[0064] 木明細書中に別記のない限り、本発明に関して用いられる科学的および技術的用語は、当業者に通常理解されている意味を有するものとする。一般的に、木明細書中に記載された細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子およびタンパク質および核酸化学に関して用いられる用語、およびその技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものとする。また、別記のない限り、本発明の方法および技術は、当該技術分野においてよく知られた慣用の方法に従って、木明細書中で引用され、議論されている種々の一般的な、およびより専門的な参考文献に記載されたとおりに行われる。かかる文献としては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harb

or Laboratory Press (1989) およびSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press (2001); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992, および2000の補遺); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology - 4th Ed., Wiley & Sons (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990); およびHarlow andLane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor LaboratoryPress (1999) などが挙げられる。

[0065] 本明細書中に記載された分析化学、合成有機化学ならびに医薬品化学および薬化学に関して用いられる用語、ならびにその実験手順および技術は、当該技術分野においてよく知られ、通常用いられているものである。標準的な技術を、化学合成、化学分析、薬剤の製造、製剤および送達、ならびに対象の処置に用いるものとする。

[0066] なお、本発明における用語「症例」は、ヒトの患者である対象をいう。

[0067] 本明細書においては、別記のない限り、タンパク質の名称は遺伝子名のアルファベット（もしくはアルファベットと数字）等のあとにタンパクと付して表記し、そのタンパク質をコードする遺伝子は、前記の遺伝子名のアルファベット（もしくはアルファベットと数字）等のみで表記するか、遺伝子名のアルファベット（もしくはアルファベットと数字）等の後に「遺伝子」と付記して表記するものとする。前記の「遺伝子」は、ゲノム遺伝子、メッセンジャーRNAまたはcDNAのいずれかを意味するものとし、いずれかを特定する場合には、特定して表記するものとする。

[0068] 本発明において、「対象」とは、大腸を有する任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコなどのコンパニオンアニマル、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどの産業動物など、そして特に好ましくはヒトである。本発明において

、対象は健常であっても、何らかの疾患に罹患していても、また疾患の治療中もしくは治療後であってもよいものとする。

[0069] 本発明において、「腫瘍」とは、細胞が異常な増殖をする状態をいい、腫瘍のうちで悪性腫瘍を「癌」という。

[0070] 本発明において、「深達度」とは、癌が大腸癌が内腔側から深層へ浸潤した度合いをいい、「浸潤度」と同義である。

[0071] 本発明において「浸潤性大腸腫瘍検出」、「浸潤性大腸腫瘍の検出、」または「浸潤性大腸腫瘍の検出方法」とは、浸潤性大腸腫瘍が存在するか否かを検出するための指標を得る方法をいう。

[0072] 木明細書において、「エピジェネティック」とは、本発明の属する技術分野における通常の意味を有するものとし、例えば、DNA配列の変化を伴うことなく、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることを例示することができる。クロマチンへの後天的な修飾の例としては、DNA塩基のメチル化のほか、ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化などの化学修飾を例示することができる。

[0073] 本発明において、「腫瘍マーカーの量」とは、組織学的な評価スコア、血液等の体液中の胎児性蛋白質、糖鎖抗原、または異所産生物質の濃度、検体中に含まれる変異した癌遺伝子または癌抑制遺伝子の量、検体中に含まれる腫瘍関連遺伝子のメチル化DNAの量をいう。

[0074] 本発明において「DNAメチル化」とは、任意のゲノム遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドにおけるシトシンがメチル化されることをいう。

[0075] 本発明において「ＤＮＡ過剰メチル化」または「過剰メチル化」とは、任意のゲノム遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドが、正常細胞に比べて過剰にメチル化された状態をいう。

[0076] 本発明において「CpGアイランドのメチル化」とは、任意のゲノム遺伝子のプロモーター領域に存在するCpGアイランドにおけるDNAメチル化をいう。

[0077] 本発明において「メチル化DNA」とは任意のゲノム遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドにおけるメチル化されたシトシンをいい、「メチル化DNA

の割合」とは当該領域における全てのCpGアイランド中のシトシンに占める「メチル化DNA」の割合をいう。

[0078] 本発明において「メチル化DNAの量」とは、任意のゲノム遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドにおけるメチル化されたシトシンの量をいう。「メチル化DNAの量」は、「メチル化DNAの割合」として表示することもできる。

[0079] 本発明において「浸潤腫瘍」とは粘膜筋板を超え、粘膜下層以深に浸潤した癌をいう。

[0080] 本発明において「非浸潤腫瘍」とは粘膜内に留まる癌をいう。

[0081] 本発明において「非癌」とは大腸癌に罹患していない対象、または大腸癌に罹患していない対象から採取した検体を指して用いる。

[0082] 本発明において「浸潤性大腸腫瘍検出用検体」とは、洗浄液を大腸粘液層に散布して該粘液層から粘液を剥離することにより得られる、剥離された粘液を前記洗浄液中に含む、浸潤性大腸腫瘍が存在するか否かを検出するための指標を得るための検体をいう。

[0083] 本発明において「大腸粘液層」とは、大腸内腔の粘膜の表層にある粘液層をいう。

[0084] 本発明において「大腸粘液層剥離液」とは、洗浄液を大腸粘液層に散布して該粘液層から粘液を剥離することにより得られる液体をいう。

[0085] 本発明において「生理的な等張液」とは、大腸粘膜を刺激する成分を含有しない、中性付近のｐＨである等張液をいう。

[0086] 本発明において「hsa-mir-34b/c」と「mir-34b/c」は、ともにmicro RNA 34bおよびmicro RNA 34cに共通するゲノム遺伝子を意味する。通常の用語として「mir-34b/c」といった場合には、転写されたmicro RNAを指すことがあるため、ゲノム遺伝子を指すことを強調するために「hsa-mir-34b/c」との用語を用いている。

[0087] 本発明においてメチル化DNAの検出に用いるプライマーの配列の標記において、「Y」で表記される塩基は、メチル化されていないCpGアイランド中のシトシンを検出する場合にはチミン（T）を意味するものとし、メチル化されて

いるCpGアイランド中のメチル化シトシンを検出する場合にはシトシン(C)を意味するものとする。

本発明においてメチル化DNAの検出に用いるプライマーの配列の標記において、「R」で表記される塩基は、アデニン(A)またはグアニン(G)を意味し、「R」がアデニン(A)であるプライマーと「R」がグアニン(G)であるプライマーを混合して用いられる。

[0088] 本発明において「ROC曲線」とは、受信操作特性曲線またはReceiver Operating Characteristic Curveをいう。

[0089] ROC曲線は、連続する数値で表される検査結果に基づいて、特定の疾患が陽性であるか陰性であるかを判断する場合に、陽性または陰性と判断する閾値を決定するために用いることができる。

[0090] ROC曲線において、「感度(sensitivity)」とは陽性と判定されるべき検体を正しく陽性と判定する割合を示し、「特異度(specificity)」とは陰性と判定されるべき検体を正しく陰性と判定する割合を示す。通常、陽性と判定されるべき検体を正しく陽性と判定した場合を「真陽性」と定義され、陽性と判定されるべき検体を誤って陰性と判定した場合を「偽陰性」と定義され、陰性と判定されるべき検体を正しく陰性と判定した場合を「真陰性」と定義され、陰性と判定されるべき検体を誤って陽性と判定した場合を「偽陽性」と定義される。そして、「感度」は、真陽性の件数を真陽性の件数と偽陰性の件数の和で割ることによることにより求めることができる。また、「特異度」は、真陰性の件数を偽陽性の件数と真陰性の件数の和で割ることにより求めることができる。

[0091] 「AUC」はROC曲線の下側の面積を示す。「AUC」は0.5～1.0の値となり、1.0に近づくほど優れた検査方法であることを示す。

[0092] 浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍を区別するために最も適した閾値である「ベストカットオフ値」は、ROC曲線中の左上のポイントである、「感度」が1で、「1−特異度」が0である点からの距離が最も短いROC曲線上の点として求めることができる。

[0093] [表1]

表１　検体を採取した対象の特性

腫瘍	過形成性ポリープ	腺腫	早期癌	進行癌
年齢（平均±SD）	６３　２	６６　０４７	６８　２１	６７　２７
男性	５	５２	１５	３２
女性	５	１１	４	１６
内視鏡所見				
隆起型	０	３２	７	
平坦型	１０	２９	７	
陥凹型	０	１	３	
Bormann １型				７
Bormann ２型				３１
Bormann ３型				６
Bormann ４型				０
その他				４
組織学的グレード				
軽度～中等度の異形成		５１		
高度の異形成		５		
分化の程度				
高分化型～中分化型			１９	４５
未分化型（低分化腺癌および印環細胞癌）			０	１
腫瘍の大きさ				
２０ｍｍ未満	１０	５７	２	０
２０ｍｍ以上	０	６	１７	４６
臨床ステージ				
ステージ０			１２	０
ステージ１			５	８
ステージ２			２	３２
ステージ３			０	５
ステージ４			０	１

[0094] [表2]

表２　方法１を用いて得られた検体と方法２を用いてられた検体の間における
DNA含有量と症例の対比

症例数	11				37			
	生検	大腸粘液層剥離液（方法１）			生検	大腸粘液層剥離液（方法２）		
		合計	浸潤腫瘍	非浸潤腫瘍		合計	浸潤腫瘍	非浸潤腫瘍
ＤＮＡ量	21.28±15.52	15±11.12			17.08±13.0	16.53±16.88		
診断可能症例数		2	1	1		17	11	6
診断不可能症例数		9	7	2		20	7	13
診断可能症例の割合		18.2%	12.5%	33.3%		45.9%	31.6%	61.1%

[0095] [表3]

表３　生検組織の症例と方法２により採取した大腸粘液層剥離液の症例の対比

		生検				大腸粘液層剥離液（方法２）			
		浸潤腫瘍	非浸潤腫瘍	有意差	正常組織	浸潤腫瘍	非浸潤腫瘍	有意差	正常組織
症例数		52	98		187	36	34		6
平均年齢		67 4	66 7	なし	67 2	68	63 97	なし	61 67
性別	男	16	24	なし	126	22	25	なし	3
	女	36	74	なし	61	14	9	なし	3
腫瘍の大きさ	２０mm未満	9	77			7	17		
	２０mm超	43	21			29	8		
組織学所見	過形成または炎症性		15				3		
	管状腺腫		29				10		
	腺管絨毛腺腫		28				7		
	高度の異形成		26				14		
	癌	52				36			

[0096] [表4]

表４　K-RAS 変異の検出率

	浸潤腫瘍	非浸潤腫瘍	全検体
生検組織	9	6	14
粘液剥離液（方法２）	7	2	8
一致率	77 7%	33%	62%

実施例

[0097] 以下、実施例に基づいて木発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0098] <実施例「ノ　検体の採取方法の検討

検体は、2008年11月から2009年6月までの間に、秋田赤十字病院　消化器内視鏡センターで採取した。検体を採取した対象は、長年、大腸腺腫があり経過観察目的に大腸内視鏡検査を受けた患者、大腸癌の手術前検査のために大腸内視鏡検査を受けた患者、および健康診断において便潜血反応が陽性であったために精密検査を目的として大腸内視鏡検査を受けた被験者とし、生検検体は浸潤腫瘍５２検体、非浸潤腫瘍９８検体、正常粘膜「８７検体を対象とした。粘液層剥離液は浸潤腫瘍３４検体、非浸潤腫瘍３６検体、正常粘膜６検体を対象とした。検体を採取した対象の特性を表「に示す。「過形成性ポリープ」、「腺腫」、「早期癌」、「進行癌」は、いずれも病理組織学的診断により判定された。隆起型、平坦型、陥凹型、Bo rmann 「型、Bo rmann 2型、Bo rmann 3型、Bo rmann 4型の分類は大腸癌取扱い規約に従った。異

形成の程度の判定および分化の程度の判定は病理組織学的診断により判定された。腫瘍の大きさは、病理標本を測定した。臨床ステージの判定は大腸癌取扱い規約、TNM分類に従った。

[0099] 検体の回収方法を検討するため、大腸癌症例「3例で大腸ファイバーより直接50ｍｌサイズの注射筒を用いて腫瘍部位に、毎秒５ｍｌの速度で水道水を散布し、剥離した粘液層を含む10ｍｌの水を回収する方法（方法「）、あるいは、大腸癌症例４６症例でピオクタニン散布用のチューブ（NT tube、オリンパス製）より、腫瘍部位に、毎秒５ｍｌの速度で生理食塩水20ｍｌを散布し、剥離した粘液層を含む10ｍｌの水を回収する方法（方法２）のいずれかによって、検体を採取した。方法「によって検体を採取した対象は「「症例、方法２によって検体を採取した対象は37症例であった。ピオクタニン散布用のチューブを用いて、腫瘍部位に生理食塩水を散布する前の大腸内腔の写真（図「A）、散布中の大腸内腔の写真（図「B）、および散布中の大腸内腔の写真（図「㈹ を、図「に示す。

[0100] 得られた検体は、1500rpmの速度で「0分間遠心して、細胞を沈殿させ、上清を棄てたのち、その一部をホルマリンで固定した後にヘマトキシリン・エオジンで染色して、細胞の形態を観察した。大腸大腸粘液層剥離液の細胞診(進行癌21症例、早期癌5症例、腺腫15症例)を行い、大腸腫瘍の病理診断と大腸粘液層剥離液の細胞診を比較した。進行癌10症例(合致率 47.6%)、早期癌0症例(合致率 0%)、腺腫4症例(合致率 26.6%)において生検と細胞診の結果が合致した。これらの結果より、大腸粘液層剥離液に大腸癌細胞が浮遊しており、特に進行大腸癌の粘膜剥離液に顕著に腫瘍細胞が含まれることが示唆された。方法「または方法２により採取した検体中の細胞の写真を図２に示す。Method 1では細胞が少なく、細胞の変性が強い。Method 2では変性が弱くなり、細胞診によりadenocarcinomaと診断できる症例を認めた。また一部の症例で細胞診を施行したところ、方法「では細胞数が少なく、細胞に変性が多い、方法２では細胞数が多く、変性も少ない像が得られた。以上より方法２で粘液層の腫瘍細胞を効率よく回収でき、腫瘍細胞の異常メチル化を解析

することが可能であると考えられた。

[0101] さらに、遠心分離した上記の検体よりDNAを抽出し、得られたDNAの量を比較した。表２に示すように、方法「を用いて得られた検体と方法２を用いてられた検体の間のDNA含有量に大きな差は認められなかった。方法「により採取した検体のＤＮＡ量は、大腸粘液層剥離液では「５．００ア「「．「２μｇ、生検組織では２「．２８ア「５．５２μｇであった。一方、方法２により採取した検体のＤＮＡ量は、大腸粘液層剥離液では１６．５３ア１６．８８μｇ、生検組織では「７．０８ア「３．００μｇであった。方法「と方法２のいずれを用いても得られるDNA量に差は認められず、また、大腸粘液層剥離液から得られるDNA量と組織からの得られるＤＮＡ量に差は認められなかった。

[0102] なお、DNAの抽出は次のようにして行なつた。検体の遠心分離後に、上清を除去し、ペレットを４．５ｍｌのＳ＝ＤＴＡ中に再懸濁した。これに、「０％のＳＤＳを０．５ｍｌおよび２０ｍｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫ（タカラバイオ株式会社、Code No.9033）を５０ｍｌそれぞれ加え、５５℃で「時間インキュベートした。フェノール（UltraPure Buffer-Saturated Phenol、Invitrogen life technologies）を５ｍｌ加え、転倒混和後、２７００ｒｐｍ、４℃で「５分遠心分離し、上清を新しいチューブへ移した。この操作をさらに「～2回繰り返し、溶媒を同量のクロロホルム（和光純薬工業株式会社）に変えてさらに「～2回繰り返した。グリコーゲン５ｍｌ（Ambion、Cat#g510）および「００％エタノール９ｍｌを加え、転倒混和後、４℃にて「２時間インキュベートした。その後、検体を２７００ｒｐｍ、４℃で「５分遠心分離して上清を捨て、ペレットを７０％エタノール「０ｍｌに懸濁後、２７００ｒｐｍ、４℃で「５分遠心分離し、上清を捨て、精製水２００ｍｌに溶解し、ＤＮＡ分析用試料を得た。

[0103] ＤＮＡ量は、検体中に含まれるＤＮＡの回収量を、分光光度法により測定した。分光光度法は、NanoDrop ND-1000分光光度計（旭テウノヴラス株式会社）を用い、製造者のマニュアルに従って行った。

[0104]　同じ対象について病理組織学的検査を行い、粘膜下層以深への浸潤を認める場合に浸潤腫瘍と診断し、非癌または粘膜内に留まる癌である場合に非浸潤腫瘍と診断した。また、方法「を用いて得た検体を用いて、病理組織学的により浸潤腫瘍か非浸潤腫瘍かを診断した。これらの結果を表２にまとめた。方法「を用いて採取した検体では、浸潤腫瘍の12.5%と非浸潤腫瘍の33.3%しか正しく診断できなかった一方で、方法2を用いて採取した検体では、浸潤腫瘍の31.6%と非浸潤腫瘍の61.1%を正しく診断できた。したがって、方法２を用いて採取した検体が、浸潤性大腸癌検出用の検体として、方法「を用いて採取した検体よりも優れていることがわかった。

[0105]　さらに、生検組織と方法２により採取した大腸粘液層剥離液とを対比するため、それぞれの、検体を得た症例の特性を表３に示した。生検組織を得た症例と方法２により大腸粘液層剥離液を得た症例の間で、平均年齢、男女数に有意な差は見られなかった。表３中、浸潤腫瘍か非浸潤腫瘍かの判定は、病理組織学的検査により行なった。これらの結果により、性別や年齢による有意差は認められなかった。方法２を用いて採取した大腸剥離液と大腸腫瘍の生検より得られたDNAの量の平均はそれぞれ、12.28ア1.24mg(N=87)、15.86ア0.633 mg(N=365)であり、大腸内視鏡で得られた大腸粘液層剥離液には解析に十分なDNA量が存在することが明らかとなった。

[0106]　<実施例２ノ　メチル化DNAの測定およびK-RAS変異の測定

次に、全症例について、メチル化DNAの測定を行なった。

まず、大腸内視鏡検査を行い、全大腸内視鏡検査で腫瘍を認めた場合に、ピオクタニン散布用のチューブ（NT tube 、オリンパス製）を用い腫瘍に近接した位置から洗浄液を散布することにより大腸内腔側の表面の粘液を剥離した。その際、洗浄液は、およそ、毎秒５ｍｌの速度で大腸粘液層に散布した。

[0107]　その後、拡大内視鏡（C F260AZI）観察後、腫瘍の癌部、腺腫部、腫瘍周辺（1cm以内）の背景正常粘膜を生検にて採取して、EMRやマーキング等の処置を行なった。採取された検体は、エンドフレッシュにて保管し、冷凍保存後

、フェノールクロロホルム法によりDNA抽出を行った。

[0108] 採取された生検と大腸粘液層剥離液は、それぞれDNA抽出を行った後、QIAGEN社のEpitect bisulfite kit を用いて、その取扱説明書である「EpiTect（登録商標）Bisulfite プロトコールとトラブルシューティング」および「EpiTect（登録商標）Bisulfite Handbook」に記載のプロトコールに従って亜硫酸水素ナトリウム処理を行い、そのbisulfite DNA 1 μl使い、PCRを行った。

全てのprimerは、大腸癌でメチル化が報告されている SFRP1、SFRP2、DKK2、microRNA34b/cのメチル化ＤＮＡを検出するためのprimerを用いた。

[0109] 具体的には、mir-34b/c遺伝子については、フォワードプライマーとして配列番号１のＤＮＡ、リバースプライマーとして配列番号２のＤＮＡ、パイロシークエンスプライマーとしては配列番号３のＤＮＡを使用した。

[0110] また、SFRP1遺伝子については、フォワードプライマーとして配列番号4のＤＮＡ、リバースプライマーとして配列番号5のＤＮＡ、パイロシークエンスプライマーとしては配列番号6または7のＤＮＡを使用した。

[0111] また、SFRP2遺伝子については、フォワードプライマーとして配列番号8のＤＮＡ、リバースプライマーとして配列番号9のＤＮＡ、パイロシークエンスプライマーとしては配列番号10のＤＮＡを使用した。

[0112] 同様に、DKK2遺伝子については、フォワードプライマーとして配列番号11のＤＮＡ、リバースプライマーとして配列番号12のＤＮＡ、パイロシークエンスプライマーとしては配列番号13または14のＤＮＡを使用した。

[0113] 全てのPCR assay では、denaturation step 95℃ 30秒その後annealing step 60℃ 30秒extension step 72℃ 30秒を50サイクルいった。その後、pyrosequencerによりメチル化ＤＮＡを定量的に測定し、primerの上流のCpG siteのそれぞれのメチル化の数値を平均した値を採用した。

[0114] K-RAS遺伝子の変異に関しても、パイロシークエンス法を用いて、コドン12およびコドン13を測定した。

K-RAS遺伝子の変異の測定は、QIAGEN社のKRAS検出キットであるPyroMark K

RAS v2.0 (4×24)（カタログ番号970452）を用いて、その取扱説明書である「PyroMark（登録商標）KRAS v2.0 Handbook」に記載のプロトコールに従って測定した。

[0115] 生検組織ではSFRP1、SFRP2、DKK2、mir34b/cのメチル化は非癌部と腺腫、癌部で徐々に上昇する傾向を認めたが、有意差を認めなかった。一方、粘膜剥離液を用いたメチル化DNAの解析では、進行癌と非癌部において、SFRP1のメチル化DNAは、癌部で52.5%、非癌部で11.0%であり、P<0.001の有意水準で有意差が認められた。microRNA34b/cのメチル化DNAは、癌部で26.39%、非癌部で5.33%であり、P=0.0007の有意水準で有位な差を認めた。同様に、早期癌と非癌部で比較すると、SFRP1のメチル化DNAは早期癌で41.2%、非癌部で11.0%であり、P=0.0043の有意水準で優位さを認めた。microRNA34b/cのメチル化DNAは、早期癌で23.38%、非癌部で5.33%であり、P=0.0220の有意水準で有意差を認めた。腺腫と非癌部で比較すると、SFRP1のメチル化DNAは、腺腫で32.6%、非癌部で11.0%であり、P=0.0089の有意水準で優位さを認めた。microRNA34b/cのメチル化DNAは、腺腫で17.17%、非癌部で5.33%であり、P=0.0306の有意水準で有意差を認めた。また、癌の深達度とメチル化との関係では、深達度がmまたはmp以深で有意に差があったのは、SFRP1のメチル化DNAは、深達度mで33.39%、深達度mpで57.17%であり、(P=0.0230の有意水準で有意差を認めた。microRNA34b/cのメチル化DNAは、深達度mで15.62%、深達度mpで29.36%であり、P=0.0477の有意水準で有意差を認めた。全体の生検と大腸粘液層剥離液の間で相関が見られたのは、microRNA34b/cのメチル化DNAのみであり、有意水準はP<0.001、相関係数はR値0.4296ア0.1000であった。

[0116] 表3で得た同一病変由来の検体中の一部の検体を用いて、K-RAS遺伝子の変異の有無を検討して、その結果を表4に示した。生検組織を用いても、方法2により採取した粘液剥離液を用いても、77.7%の検体で一致して浸潤腫瘍を検出できたことがわかる。尚、検体の合計数が一致しないのは、生検でK-RAS遺伝子の変異を検出できても、粘液剥離液ではK-RAS遺伝子の変異を検出で

きない症例があるためである。このような症例は特に非浸潤腫瘍に多かった。

[0117] <実施例3ノ 内視鏡分類

大腸内視鏡での腫瘍の形態をhyperplastic polyp、adenoma、early Gancerをprotruded type(0-I)、川at type(IIa、LST)、depressed type(IIc、IIa+IIC)に分類した。Early Gancerは、癌浸潤がsubmucosal layerまでに達するものとした。静脈浸潤、リンパ管浸潤は問わない。Advaced Gancer はborrmann分類を適応した。全ての大腸腫瘍の手術やEMR標本は、秋田赤十字病院病理部でWHO分類に従い、臨床診断されている。

[0118] <実施例4ノ 細胞診

大腸粘液層剥離液の細胞診に関しては、秋田赤十字病院 消化器センターで採取された大腸粘液層剥離液を、CYTYC社のThinPrep(登録商標)PreservCyt Solution Vials (20ml. prefilled / Box of 50vials、注文番号 023400 5)に保存し、遠心後ホルマリン固定を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色後、細胞診を行った。

[0119] <実施例5ノ 統計解析

全ての統計、グラフについては、PRISM version 5 for windows日本語版セットで行った。メチル化に関しては、それぞれのCpG siteのメチル化の平均をその検体のメチル化として、臨床診断、深達度についてまとめた。有意差に関しては、それぞれの群で一元は位置分散分析による検定を行った。相関関係では、t検定を行った。

[0120] <実施例6ノ ROC曲線

mir34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2の各遺伝子のメチル化DNAを指標として、浸潤性大腸癌の検出を行う際の閾値を決定するために、ROC曲線を作成した(図4)。mir34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2、ベストカットオフ値は、それぞれに順に、17.8%、45%、33%、11%であった。

[0121] <実施例7ノ 腫瘍の直径が20mm未満または20mm以上である場合のROC曲線

腫瘍の直径が20mm未満である場合、および腫瘍の直径が20mm以上である場合に分けてROC曲線を作成した（図5）。大腸の内腔側から測定した腫瘍の直径が20mm未満である場合には、mir-34b/c遺伝子およびSFRP1遺伝子のメチル化ＤＮＡを指標としたROC曲線を作成した（図5左）。また、大腸の内腔側から測定した腫瘍の直径が20mm以上である場合には、mir-34b/c遺伝子およびDKK2遺伝子のメチル化ＤＮＡを指標としたROC曲線を作成した（図5右）。これらの結果から、腫瘍の直径が20mm以下である場合の浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍の区別にはmiR34b/cまたはSFRP遺伝子のメチル化ＤＮＡを指標とする野が好ましく、腫瘍の直径が20mm以上である場合の浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍の区別にはmiR34b/cまたはDKK2遺伝子のメチル化ＤＮＡを指標とする野が好ましいことがわかる。

[0122] <実施例8> 腫瘍の大きさとメチル化ＤＮＡを組合わせた診断フロー図

大腸の内腔側から測定した腫瘍の直径とメチル化ＤＮＡの測定を組合わせて、もっとも精度よく浸潤腫瘍の有無を診断するための、フロー図を作成した（図6）。このフロー図を用いれば、左端の枠内に記載した、腫瘍の直径が20mm以上である場合（Yes）と腫瘍の直径が20mm以上でない場合（No）の判断から開始して、順に右側の枠内の判断基準にしたがって次の枠に進むことにより、浸潤腫瘍か非浸潤腫瘍のいずれかの診断がなされる。

[0123] <実施例9> 大腸粘液層剥離液のメチル化ＤＮＡと生検組織のメチル化ＤＮＡの相関

浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍のそれぞれについて、mir34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2の各遺伝子のメチル化されたDNAの割合が、大腸粘液層剥離液と生検組織とで相関するか検討した。その結果、浸潤腫瘍における、mir34b/c、SFRP1、SFRP2の各遺伝子のメチル化されたDNAの割合は、大腸粘液層剥離液と生検組織とで、3%以下の危険率で有意に相関していた。また、浸潤腫瘍と非浸潤腫瘍を合わせた全体において、mir34b/c、SFRP1、SFRP2、DKK2の各遺伝子のメチル化されたDNAの割合は、5%以下の危険率で有意に相関していた。

産業上の利用可能性

[0124] 本発明の検体、キット、および方法は、対象の大腸粘液層に洗浄液を散布して該粘液層から粘液を剥離し、剥離された粘液を洗浄液とともに回収することにより、非侵襲的に大腸癌または大腸腫瘍の浸潤性または深達度を診断するための指標を得る方法を提供する画期的な発明である。本発明の検体、キット、および方法を利用することにより、非侵襲的に、しかも高い精度で、大腸癌または大腸腫瘍の浸潤性または深達度を診断しうるので、大腸癌の治療方法の選択に際して有用である。また、本発明の検体、キット、および方法を利用することにより、抗癌剤を包含する様々な薬剤に対する感受性を予め検討することもできる。さらにまた、本発明の検体、キット、および方法により、薬剤および／または治療方法の治療効果を評価することが可能となる。本発明の検体、キット、および方法により、再発の予測をするための指標を得ることが可能となる。したがって、本発明の検体、キット、および方法は、産業上の利用可能性を有する。

請求の範囲

[請求項1] 浸潤性大腸癌検出のための検体であつて、大腸粘液層に洗浄液を散布して大腸粘液を剥離し、剥離した大腸粘液とともに回収して得られる前記洗浄液を含む、前記検体。

[請求項2] 大腸粘液層が、腫瘍部位を含む大腸粘液層である、請求項1に記載の検体。

[請求項3] 洗浄液が、生理的な等張液である、請求項1または2に記載の検体。

[請求項4] 生理的な等張液が、生理食塩水である、請求項3に記載の検体。

[請求項5] 散布が、毎秒２ｍｌ～「０ｍｌの速度で行なわれる、請求項「～4のいずれか一項に記載の検体。

[請求項6] 検出が、腫瘍マーカーの検出である、請求項「～5のいずれか一項に記載の検体。

[請求項7] 腫瘍マーカーの検出が、メチル化ＤＮＡの検出である、請求項「～6のいずれか一項に記載の検体。

[請求項8] メチル化ＤＮＡの検出が、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/c、p16INK4A、日カドヘリン、hMLH1、14-3-3 sigma、BNIP3、CHFR、CUTA、IGFBP7、Histone H3K27、HRK、CACNA1G、COX2、DNA5、RASSF2からなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡの検出である、請求項「～7のいずれか一項に記載の検体。

[請求項9] メチル化ＤＮＡの検出が、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/cからなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡの検出である、請求項8に記載の検体。

[請求項10] 洗浄液が、前洗浄なしで散布される、請求項「～9のいずれか一項に記載の検体。

[請求項11] 腫瘍部位が、腫瘍の浸潤が疑われる腫瘍部位である、請求項2に記載の検体。

[請求項12] 検体が、「０μｇ以上のDNAを含む、請求項「～「「のいずれか一項に記載の検体。

[請求項13] 浸潤性大腸癌検出のためのキットであって、大腸粘液層に洗浄液を散布して大腸粘液を剥離するための洗浄液散布用器具および洗浄液を含む、前記キット。

[請求項14] 浸潤性大腸腫瘍を検出する指標を得る方法であって、
大腸粘液層に洗浄液を散布して大腸粘液を剥離する工程、
剥離した大腸粘液とともに洗浄液を回収する工程、
回収した洗浄液中の腫瘍マーカーの量を決定する工程、および、
腫瘍マーカーの量に基づいて浸潤性大腸腫瘍が存在すると決定するための指標を得る工程、
を含む、前記方法。

[請求項15] 大腸粘液層が、腫瘍部位を含む大腸粘液層である、請求項14に記載の方法。

[請求項16] 洗浄液が生理的な等張液である、請求項１４または１５に記載の方法。

[請求項17] 生理的な等張液が、生理食塩水である、請求項１６に記載の方法。

[請求項18] 散布が、毎秒２ｍｌ～１０ｍｌの速度で行なわれる、請求項１４～１７のいずれか一項に記載の方法。

[請求項19] 腫瘍マーカーが、メチル化DNAである、請求項１４～１８のいずれか一項に記載の方法。

[請求項20] 腫瘍マーカーが、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/c 、p16INK4A、Eカドヘリン、hMLH1、14-3-3 sigma、BNIP3、CHFR、CIITA、IGFBP7、Histone H3K27、HRK、CACNA1G、COX2、DFNA5、RASSF2からなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡである、請求項１４～１９のいずれか一項に記載の方法。

[請求項21] 腫瘍マーカーが、SFRP1、SFRP2、DKK2、hsa-mir-34b/cからなる群より選択される遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡである、請求項２０に記載の方法。

[請求項22] 指標が、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが４５％

を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項23] 指標が、S RP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが5「%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項24] 指標が、S RP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項25] 指標が、S RP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが33%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項26] 指標が、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「0%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項27] 指標が、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「「%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項28] 指標が、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項29] 指標が、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「8%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項30] 指標が、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、かつ、mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化DNAが「5%を越えている場合である、請求項「4 〜2 「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項31] 指標が、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、

mir-34b/c遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが「５％以下であり、かつ、DKK2遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが「0%を越えている場合である、請求項「４～2「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項32] 指標が、大腸の内腔側から観察した腫瘍の直径が20mm以上であり、SFRP1遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが５「%を越えていて、かつ、SFRP2遺伝子のプロモーター領域のメチル化ＤＮＡが「0%を越えている場合である、請求項「４～2「のいずれか一項に記載の方法。

[請求項33] 指標が、薬剤および／または治療方法の治療効果を評価するために用いる指標である、請求項「４～3２のいずれか一項に記載の方法。

[図1]

図1

[図2]

図2

方法 1

方法 2

[図4]

図4

miR34b/c
sensitivity
1-specificity
AUC 0.796
Best cut-off 17.8%
Sensitivity 0.833
Specificity 0.765

SFRP1
sensitivity
1-specificity
AUC 0.736
Best cut-off 45.0%
Sensitivity 0.750
Specificity 0.708

SFRP2
sensitivity
1-specificity
AUC 0.688
Best cut-off 33.0%
Sensitivity 0.583
Specificity 0.765

DKK2
sensitivity
1-specificity
AUC 0.702
Best cut-off 11.0%
Sensitivity 0.805
Specificity 0.647

[図5]

図5

SIZE <20mm
sensitivity
1-specificity
miR34b/c
SFRP1

SIZE 20mm≤
sensitivity
1-specificity
miR34b/c
DKK2

[図6]

図６

N
Test
Yes IC/positive
No IC/negative
P value
Notes
N=68
Tumor size 20mm≦
Yes 29/38
No 6/31
P<0.001
Yes
No
N=38
miR34b/c 15%<
Yes 25/28
No 4/10
P=0.005
N=31
SFRP1 51%<
Yes 5/8
No 1/23
P=0.002
Invasive cancer
N=10
DKK2 10%<
Yes 4/4
No 0/6
P=0.005
N=8
SFRP2 10%<
Yes 5/6
No 0/2
P=0.035
Non-invasive tumor
Invasive cancer
Non-invasive tumor
Invasive cancer
Non-invasive tumor

[図7]

図７

Total
IC
NI
miR-34b/c
P=0.0193
R=0.2222
P=0.0221
R=0.2726
P=0.4307
R=009419
SFRP1
P=0.0106
R=0.3970
P=0.0100
R=0.4962
P=0.2160
R=0.2423
SFRP2
P=0.0346
R=0.3012
P=0.0191
R=0.5684
P=0.2645
R=0.1888
DKK2
P=0.024
R=0.2285
P=0.0884
R=0.2392
P=0.0994
R=0.2417
wash
biopsy

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/064715

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/50 (2006.01)±, A61B1/00 (2006.01)i, C12M3/00(2006.01)i, C12Q1/02 (2006 .01) i, C12 Ql / 68 (2006 .01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/50 , A61B1/00 , C12M3/00, C12Q1/02 , C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/BIOSIS (STN) , JSTPlus/ JMEDPlus/ JST7580 (JDreamll)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ISHIBASHI et al., "Determining the telomerase activity of exfoliated cells in intestinal lavage solution to detect colorectal carcinoma", Japanese Journal of Clinical Medicine, 1998, vol. 56, no. 5, pages 117 to 121, page 118, '2. method'	1-12
X	TOMIKI Y, et al., CANCER CELL EXFOLIATION BY PREOPERATIVE COLONOSCOPIC EXAMINATION, Digestive Endoscopy, 2000, Vol. 12, p.327-330, 'SUBJECTS AND METHODS', fig. 1, RESULT	1-12

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [ ] See patent family annex

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 November, 2010 (10.11.10)	30 November, 2010 (30.11.10)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japanese Patent Office	
Facsimile No.	Telephone No

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2010/064715

C (Contmuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	JP 2007-534404 A (UCL Biomedica PLC.), 29 November 2007 (29.11.2007), claims; drawings & US 2005/0261553 Al & GB 409474 D & EP 1740085 A & WO 2005/117685 Al & CA 2555180 A & CN 1905832 A	13
A	SUZUKI et al., "Atarashii Daicho Gan Yokusei Idenshi -SFRP-", Japanese Journal of Clinical Medicine, 2005, vol. 63, no.4, pages 707 to 719	1-13
A	FUJII et al., "Kaiyosei Daichoen ni Okeru DNA Methyl-ka wa Hatsugen no Bunshi Marker to Narieru ka?", G.I.Research, 01 August 2009 (01.08.2009), vol. 17, no. 4, pages 304 to 311	1-13
A	WO 2007/132844 Al (Sapporo Medical University), 22 November 2007 (22.11.2007), & US 2010/0068702 A & EP 2022861 Al & KR 10-2009-0020595 A & CN 101443462 A	1-13

INTERNATIO NAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2010/064715

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons

1. [X] Claims Nos. 14 - 33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely
Claims 14 - 33 involves "a step of spraying a cleaning liquid onto the raucous liquid layer of a large intestine and removing the mucous liquid", and therefore pertain to "method for surgery of the human body", (continued to extra sheet)

2. [ ] Claims Nos.
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. Ill Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1 [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims

2 [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees

3 [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos :

4. [ ] No required additional search fccs were timely paid by the apphcant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant' s protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

国際調査報告	国際出願番号 ＰＣＴノＪＰ２Ｏ１０ノ０６４７１５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

IntCl　G01N33/50 (2006. 01) i, A61B1/00 (2006. 01) i, C12M3/00 (2006. 01) ı, C12Q1/02 (2006. 01) i, C12Ql/68 (2006. 01) i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

IntCl　G01N33/50, A61B1/00, C12M3/00, C12Q1/02, C12Q1/68

最小限資叫以外ꝏ資片て調査を行った分野に含まれるもฅ

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査て使用した電子テ━タへ━ス（テ━タへ━スℴ名称、調査に使用した用語）

MEDLINE/BIOSIS (STN)、JSTP1US/ .TMEDP1US/TST7580 (皿reamll)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテコリー＊	引用文献名　及ひ一部の箇所か関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請大項の番号
X	石橋他，腸管洗浄液中テロメラーゼ活性測定による大腸癌診断の試み， 日木臨床，1998，56 巻 5 号，117-121 ペーシ、 118 ペーシ「２．方法Ｊ の欄	1-12
X	TOMIKI Y, et al., CANCER CELL EXFOLIATION BY PREOPERATIVE COLONOSCOPIC EXAMINATION, Digestive Endoscopy, 2000, Vol. 12, p. 327-330, rSUBJECTS AND METHODS」、Fig. 1、及び，RESULT	1-12

旺　Ｃ欄の続きにも文献か列挙されている。　　汀　パテントファミリ—に関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテコリー
「A」特に関連のある文献て泣なく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許てあるか、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権王張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
rpj 国際出願日前て、かつ優先権の王張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出順日又は優先日後に公表された文献てあって出順と矛盾するものてはなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献てあって、当該文献のみて発明の新規性又は進歩性かないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献てあって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明てある組合せによって進歩性かないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 １０．１１．２０１０	国際調査報告の発送日 ３０．１１．２０１Ｏ
国際調査機関の名称及ひあて先 日本国特許庁（ＩＳＡノＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞か関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　９２１７ 山付　梓子 電話番号　Ｏ３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

国際調査報告 | 国際出願番号 PCT／JP2010/064715

C (続き).	関連すると認められる文献	
引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2007-534404 A (ユーシーエル、バイオメディカ、パブリック、リミテッド、カンパニー) 2007.11.29, 特許請求の範囲、図面 & US 2005/0261553 A1 & GB 409474 D & EP 1740085 A & WO 2005/117685 A1 & CA 2555180 A & CN 1905832 A	13
A	鈴木他, 新しい大腸癌抑制遺伝子-SFRP-, 日本臨床, 2005, 63巻4号, 707-719ページ	1-13
A	藤井他, 潰瘍性大腸炎におけるDNAメチル化は発現の分子マーカーとなり得るか?, G.I. Research, 2009.08.01, Vol.17, No.4, p.304-311	1-13
A	WO 2007/132844 A1 (北海道公立大学法人 札幌医科大学) 2007.11.22, & US 2010/0068702 A & EP 2022861 A1 & KR 10-2009-0020595 A & CN 101443462 A	1-13

国際洞査報告

国際出順番号 PCTノJP2010／064715

第II欄 請大の範囲の一部の桐査かてきなUときの昔見（第1ヘーンの2の続き）

怯第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により この国際洞査報告は次の理由により請水の範囲の一部について作成しなかった。

1 旺 清大I亘 14－33 は この国際洞査機関か凋査をすることを要しない対象に係るものてある。

o まり

請求項14－33は「大腸粘液層に洗浄腋を散布して大腸枯腋を剥離するX程J を有するため「人の身体の手術方怯」てあり、PCT第17条(2)(a)(i)及ひPCT規則39.l(iv)の規定により、この回際調査期間か調査することを要しない対象に係るものてある。

2 ヴ 晴大項 は 有青義な国際凋査をすることかてきる程度まて所定の要件を満たしていなU国際出僻の部分に倅るものてある。o まり、

3 r 晴求項 は 従属晴求の範囲てあってPCT規刊6 4(a)の第2文及ひ第3文の規定に従って記載されていない。

第m欄 発明の早一吐か欠如しているときの青見（第1ヘーンの3の椀き）

吹に述へるょゥにこの国際出肺に二以上の発明かあるとこの国際蝸査機関は認めた。

i r 出府人かゼ要な追加洞査手数料をすへて期間内に納付したのて、この国際洞査報告は、すへての桐査可能な請大項について作成した。

2 ア 追加凋査手数料を要求するまてもなく すへての桐査可能な晴大項にOいて洞査することかてきたのて 追加凋査手数料の納けを求めなかった。

3 r 出順人かゼ要な追加桐査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったのて この国降凋査報告は 手数料の納付のあった次の晴水項のみについて作成した。

4 ﾞ 出府人かゼ要な追加洞査手数料を期間内に納付しなかったのて、この国際洞査報告は、請末の範囲の最初に記載されてUる発明に係る次の請大項にOいて作成した。

追加洞査手数料の異蟻の申立てに関する庄青

追加洞査手数片及ひ 該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出府人から異礒申立てかあった。

追加凋査手数叫の納付と共に出噸人から異議申立てかあったか、異議申立手数料か納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

追加凋査手数片の納付はあったか 異礒申立てはなかった。